

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際公開

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003年10月23日 (23.10.2003)

PCT

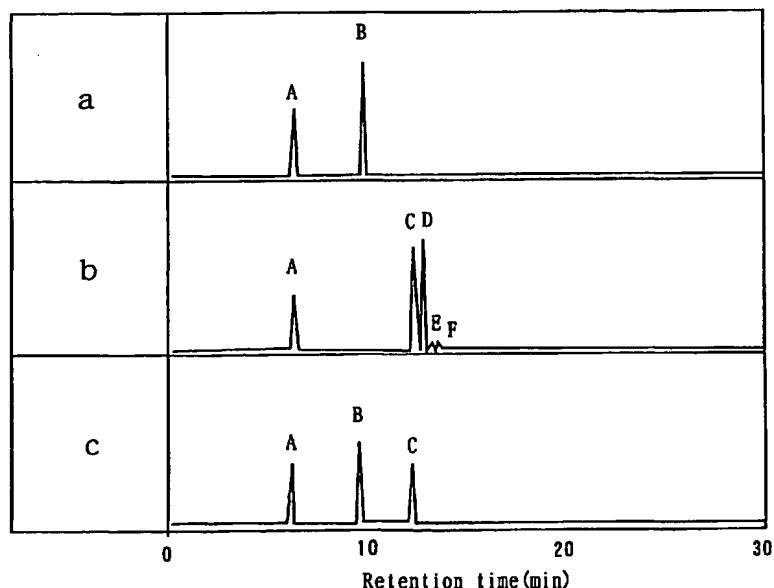
(10) 国際公開番号
WO 03/087385 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 7/64, C11C 3/14, A23L 1/054 (72) 発明者; および
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/04633 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水澤 直美 (MIZU-SAWA, Naomi) [JP/JP]; 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 酒井 正士 (SAKAI, Masashi) [JP/JP]; 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 工藤 聡 (KUDO, Satoshi) [JP/JP]; 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 白澤 幸生 (SHIRASAWA, Yukio) [JP/JP]; 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).
(22) 国際出願日: 2003年4月11日 (11.04.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2002-110773 2002年4月12日 (12.04.2002) JP
特願2002-301286 2002年10月16日 (16.10.2002) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ヤクルト本社 (KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA) [JP/JP]; 〒105-8660 東京都港区東新橋1丁目1番19号 Tokyo (JP).
(74) 代理人: 佐藤 正年, 外 (SATO, Masatoshi et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目21番19号 秀和第2虎ノ門ビル 三和国际特許事務所 Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CONJUGATED FATTY ACID AND FOOD/DRINK OBTAINED BY THE PROCESS

(54) 発明の名称: 共役脂肪酸の製造方法及び該方法により得られた飲食品



(57) Abstract: A conjugated fatty acid typified by cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid seemingly having a high physiological activity is selectively and highly efficiently produced by conjugating an unsaturated fatty acid having at least two double bonds with the use of viable cells, dead cells or a cell extract of one or more bacteria having a conjugation ability selected from the group consisting of *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* or an enzyme obtained therefrom.

[続葉有]



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: 二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を、共役化処理能を有する *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, 又は *Bifidobacterium pseudocatenulatum* の細菌群から選ばれる 1 種以上の細菌の生菌、死菌体、菌体抽出液又は該細菌より得た酵素を用いて、共役化して、生理活性が高いとされている *cis*-9,*trans*-11 型共役リノール酸に代表される共役脂肪酸を選択的かつ高効率で製造する。

明 細 書

共役脂肪酸の製造方法及び該方法により得られた飲食品

技術分野

本発明は、特に、*Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, 又は *Bifidobacterium pseudocatenulatum* から選ばれる 1 種以上の細菌を利用して特定の共役脂肪酸を効率よく製造する方法及びこの方法により得られた共役脂肪酸を含有する飲食品に関するものである。

背景技術

共役脂肪酸は隣り合う炭素が単結合を挟んで二重結合を持つ脂肪酸であるが、とりわけ炭素数 18 の脂肪酸分子内に共役ジエンを 1 個持つ共役リノール酸は、様々な生理活性を持つことが明らかにされている。

共役リノール酸を工業的に製造する方法としては、例えばリノール酸を含む油脂、あるいは遊離型のリノール酸をエチレングリコールなどの有機溶媒下で共役化するアルカリ共役化法が知られている。

アルカリ共役化法では、通常、不飽和脂肪酸と過剰のアルカリとを有機溶媒中で 150℃ 以上に加熱する。この時、得られる共役脂肪酸は、二重結合の結合位置や配置が異なる混合物の形であり、例えば原料にリノール酸を用いた場合には、cis-9, trans-11 型あるいは trans-9, cis-11 型、trans-10, cis-12 型の共役リノール酸が得られ、この他にも幾つかの位置あるいは幾何異性体を含んでいる。

従って、上記共役脂肪酸の生理作用は、共役脂肪酸の混合物としての作用であり、特定の共役脂肪酸が製造できれば学術的にも産業的にも応用価値は高い。また、アルカリ共役化法では、環化およびその他の副反応も起こり、共役脂肪酸の収率が低下すること、精製が困難になることなどの問題点も指摘されている。

一方、微生物あるいはその酵素が共役脂肪酸を作ることが報告されている。例えば、ルーメン細菌が多価不飽和脂肪酸から共役脂肪酸を産生すること (Shorland F.B., et al., Nature, vol.175, p.1129, 1955) をはじめとして、トレポネ

ーマ(*Treponema*) (Yokoyama, et al., J. Bacteriology, vol.107, p519-527, 1971)、*Butyrivibrio fibrisolvens* (Kepler C.R., et al., J. Biol. Chem., vol.242, p5686-92, 1967)、*Propionibacterium freudenreichii* (Jiang J., Doctoral thesis, Swedish Uni. Uppsala, 1998)、種々の肺の病原菌の一割強 (Jack C.I.A., et al., Clinica Chlimica Acts., vol224, p139-4, 1994) などがリノール酸異性化活性を持ち、また、これらの微生物によって産生される共役リノール酸はcis-9、trans-11型異性体が主体であることも報告されている。

一方、反芻動物は自らの体内でcis-9,trans-11型共役リノール酸を産生していることから、乳製品や畜肉にはcis-9,trans-11型共役リノール酸が多く含有されており、従って、cis-9,trans-11型共役リノール酸は通常の食生活でヒトが摂取する機会の多い共役リノール酸であると考えられる。それゆえ、本異性体の生理効果については多くの研究が行われ、種々の癌に対する防御作用があることが明らかとなってきた (Ha, Y.L., et al., Cancer Research vol.50, p1097-1101, 1990, Ip C., et al., Cancer Research vol.51, p6118-6124)。

以上のように、微生物を用いれば、抗癌作用の期待される cis-9,trans-11型共役リノール酸含量の高い生成物が得られることが期待できる。しかしながら、副産物が少なく、十分な量の共役リノール酸を産生する微生物は未だ見出されていない。

一方、腸内細菌の一種である乳酸菌や*Bifidobacterium* 属細菌も食品への利用価値の高い微生物として知られている。*Bifidobacterium* 属細菌は、ヒト大腸へ定着し、便性改善、腸内腐敗抑制など、様々な有益な作用を示すことから近年では発酵乳などにも利用されるようになってきている。

しかしながら、*Bifidobacterium* 属細菌は偏性嫌気性であり酸素の存在下や低pH下では死滅しやすいため、*Bifidobacterium* 属細菌を用いた研究を行うには、適切な作業環境や熟練した操作が必要とされる。このような理由もあって、共役リノール酸製造も含め*Bifidobacterium* 属細菌を用いた物質生産に関する研究はほとんど行われていなかった。

そのような中で、乳酸菌を利用して共役リノール酸を0.001～5重量%を含有する発酵乳組成物とその製法が提案されている (韓国特許公開番号；特2001-00898

58号(KR2001-0089858)公開日2001.10.12)。

前述の通り、アルカリ共役化法は、高温における反応のため副反応が起こりやすく特定の共役脂肪酸を得ることが困難であり、その後の精製工程が煩雑であるなどの問題点があった。また、微生物による変換反応では、all trans型共役リノール酸も同時に副産されてしまい、共役リノール酸全体の産生量も必ずしも満足し得るものではなかった。

また、前記韓国公報において乳酸菌の利用により得られる発酵乳組成物について、共役リノール酸を生成する乳酸菌としては、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus casei*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium adolescentis*、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium infantis* が開示されているが、同一の種であっても菌株が相違すると生成しないことが示され、更に、本発明に至る過程でもそのような示唆はあった。また、生成量についても、基質のリノール酸100に対して、5以上を生成する菌種は幾つかあったが、10以上を生成する菌種は得られることはなかった。

本発明は、こうした問題点を解決すべく、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化することを目的とし、特に、リノール酸から生理効果の高いcis-9,trans-11型共役リノール酸のみを選択的かつ高い含有率で効率よく得る方法を得ることを目的とする。更に、リノール酸から生理効果の高いcis-9,trans-11型共役リノール酸を高い含有率で効率良く産生する能力を有する細菌、及び、共役脂肪酸を含んだ飲食品を得ることを目的とする。

発明の開示

本発明者らは、細菌を用いた共役リノール酸の製造方法を見出すべく鋭意研究を進めた結果、ある種の*Lactobacillus* 属細菌及び／又は*Bifidobacterium* 属細菌に共役化処理能、即ち、不飽和脂肪酸分子内の二重結合の位置を移動させ二重結合同士が互いに共役する状態に異性化する能力、があることを見出した。

即ち、本発明に係る共役脂肪酸の製造法は、共役化処理能を有する*Lactobacillus* 属及び／又は*Bifidobacterium* 属細菌の生菌、死菌体、菌体抽出液又は該細菌より得た酵素を用いて、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を

共役化することにより、上述の課題を解決するものである。

具体的な共役化処理能を有する細菌としては、共役化処理能を有する *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, 又は *Bifidobacterium pseudocatenulatum* から選ばれる 1 種以上の細菌の生菌、死菌体、菌体抽出液又は該細菌より得た酵素を用いて、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化する。

本発明による方法においては、*Lactobacillus* 属細菌及び／又は *Bifidobacterium* 属細菌の生菌、死菌体、菌体抽出液又は該細菌より得た酵素を用いて二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化するものであるため、生理活性が高いとされている cis-9, trans-11 型共役リノール酸に代表される共役脂肪酸を選択的かつ高い含有率で高収率で製造することができる。

本発明による共役脂肪酸の製造方法で用いられる *Lactobacillus oris* は人の唾液から分離された細菌である (Farrow J.A.E. et al., Int. J. Syst. Bacteriol. vol.38, p116, 1988)。菌株としては、例えば、*Lactobacillus oris* NCD0 2160 (ATCC 49062), NCD0 2162, NCD0 2163, NCD0 2164 等が挙げられ、特に、NCD0 2160 (ATCC 49062) が好ましい。

また、*Lactobacillus pontis* は、ライ麦パン種から分離された細菌であり (Vogel, R.F., et al., Int. J. Syst. Bacteriol., vol.44, p223-229, 1994)、菌株としては、例えば、*Lactobacillus pontis* ATCC 51518, ATCC 51519 等が挙げられ、特に ATCC 51518 を用いることが好ましい。

また、*Lactobacillus panis* は、ライ麦パン種から分離された細菌であり (Strohmar, W., Diekmann, H., Z. Lebensm. Unters. Forsch, vol.194, p536-540, 1992)、菌株としては、例えば、*Lactobacillus panis* JCM 11053 等が挙げられ、特に JCM 11053 を用いることが好ましい。

本発明による共役脂肪酸の製造方法で用いられる *Bifidobacterium breve* は乳児・哺乳牛の糞便、膣から分離された菌株である。菌株としては、例えば *Bifidobacterium breve* ATCC 15698, ATCC 15701, YIT 10001 などが挙げられるが、特に、*Bifidobacterium breve* YIT 10001 は cis-9, trans-11 型共役リノール酸を高い

含有率で効率良く製造することができる優れた株である。尚、*Bifidobacterium breve* YIT 10001は、平成13（2001）年8月14日付けで独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18459として寄託され、平成14（2002）年10月11日付けでFERM BP-8205として、国際寄託への移管が済んでいる。この*Bifidobacterium breve* YIT 10001株は、リノール酸－BSA－複合体を含むGAM broth（日水製薬（株）社製）にて少なくとも24時間、前培養された後、この培養された*Bifidobacterium* 属細菌をリノール酸－BSA－複合体を含む乳培地に3.8wt%接種し、144時間振盪培養することにより、培地中に少なくとも0.5mg/5mlの共役リノール酸を産生する能力を有する、共役リノール酸産生能の極めて高い株であるため好ましい。このように優れた産生能を有する株は、これを用いてリノール酸を含む食品素材（例えば、乳原料）を発酵した場合に、発酵後の発酵食品（例えば、発酵乳）中に、生理効果を期待できる程度の共役リノール酸を産生させることができるので、食品製造の作業性等において特に適したものである。

また、*Bifidobacterium infantis* は、乳児の糞便から分離された菌株である。菌株としては、例えば*Bifidobacterium infantis* ATCC 15702 が挙げられる。

また、*Bifidobacterium bifidum* は、成人・乳児・哺乳牛の糞便、膣から分離された菌株であり、菌株としては、例えば*Bifidobacterium bifidum* YIT 4007 (FERM BP-791)などが挙げられる。

また、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* は、下水、乳児の糞便、哺乳仔ウシの糞便より分離された菌株であり、菌株としては、例えば*Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919などが挙げられる。

本発明において、原料として用いられる、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸は特に限定されず、例えばリノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸などいずれも好適に使用し得る。特に、リノール酸を原料として共役リノール酸を生成させた場合、生理活性の報告されている特定の異性体が特異的かつ効率よく生成し、他の異性体（副産物）の量は極微量となるため好ましい。

また、上記不飽和脂肪酸は、塩またはエステルなどを形成していても良く、塩

としては、ナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等が挙げられ、エステルとしてはメチルエステル、エチルエステルのほか上記脂肪酸を含むその他の脂質類（リン脂質、糖脂質等）、モノグリセライド、ジグリセライド、トリグリセライドなどを用いることも可能である。

また、天然油脂も原料として用いることができ、例えばリノール酸を分子内に多く含むものとしてはサフラワー油、綿実油、大豆油、ヒマワリ種子油、トウモロコシ油、落花生油、米ぬか油、アマニ油、カカオ脂などの植物由来の天然油脂などが、リノレン酸を分子内に多く含むものとしてはイワシ油、ニシン油、タラ油などの動物由来の天然油脂などが挙げられ、さらにこれらのリパーゼ分解物なども原料として用いることが可能である。

本発明においては、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を含有する培地に、前述の*Lactobacillus* 属細菌及び／又は*Bifidobacterium* 属細菌を接種し、培養することが好ましい。このための培地として、乳培地を用いることが好適である。

本発明において共役脂肪酸を製造するために*Lactobacillus* 属細菌及び／又は*Bifidobacterium* 属細菌、特に*Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, 又は*Bifidobacterium pseudocatenulatum* から選ばれる1種以上の細菌を用いて不飽和脂肪酸を共役化する処理としては、原料の不飽和脂肪酸を含有する増殖培地中で細菌を培養して直接共役脂肪酸を生成させる方法、あるいは何らかの方法で細菌を培養して集菌し洗浄した菌体（洗浄菌体）を原料の不飽和脂肪酸を含有する溶液に加えて反応させることにより共役脂肪酸を生成させる方法など何れの方法を用いることも可能である。更に、不飽和脂肪酸を含有する溶液中では、細菌の生菌体のみならず、死菌体、菌体抽出液、菌体から抽出した酵素などを利用して反応を行うことも可能である。

Lactobacillus oris, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, 又は*Bifidobacterium pseudocatenulatum* 等の*Lactobacillus* 属細菌及び／又は*Bifidobacterium*

obacterium 属細菌を培養するための培地としては、*Lactobacillus* 属細菌及び／又は*Bifidobacterium* 属細菌の増殖用に通常用いられる培地や乳を含む乳培地を用いることができ、特に乳を用いた培地中で不飽和脂肪酸を処理することが好ましい。

通常用いられている増殖培地、例えばMRS培地やGAM broth等を用いると、リノール酸等の原料油類が培地に分散せず処理効率も悪くなるため、BSA（牛血清アルブミン）等の脂質結合タンパク質や界面活性剤の添加や、厳しい条件での均質化処理が必要となる。しかしながら、乳培地を用いた場合には、BSAの添加をしなくても、原料油類の均質化が比較的容易となり、作業性、処理効率が向上し、BSA等の添加によるコスト上昇を抑制できる。また、BSA等の脂質結合タンパク質や界面活性剤は、風味への影響を与えてしまうため、特に共役脂肪酸を含む食品製造において本発明を用いる場合には、BSAを含まなくても効率よく反応を行なえる乳培地を用い、発酵乳を製造することが好ましい。

乳培地において、このような優れた分散性が得られる理由としては、乳中に含まれる蛋白成分などの影響が考えられるが定かではない。なお、本明細書において乳とは、牛乳・山羊乳などの獣乳の生乳、脱脂粉乳、全脂粉乳、生クリーム、あるいは豆乳・アーモンド乳・ココナッツミルク等の植物乳の各種乳蛋白含有物を指す。

また、前記コスト面等の問題はあものの、*Lactobacillus* 属細菌、*Bifidobacterium* 属細菌による共役リノール酸の製造にあたり、リノール酸と、BSA、脂質結合蛋白質および界面活性剤から選ばれる少なくとも1種の素材との複合体を添加した培地で全売用を行うことが好ましい。本培養における共役リノール酸の産生量を効果的に増加させられるためである。尚、前培養の時間は少なくとも12時間とすることが好ましく、特に20時間以上とすることが好ましい。

また、*Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, 又は*Bifidobacterium pseudocatenulatum* 等の*Lactobacillus* 属細菌及び／又は*Bifidobacterium* 属細菌の洗浄菌体あるいは菌体末、死菌体、菌体抽出液などを利用して反応を行う場合、洗浄菌体や菌体末、死菌体、菌体抽出液の調製は定法

に従えば良い。例えば、洗浄菌体は、生理食塩水や緩衝液などで培養菌体を洗浄して得ることができ、菌体末は凍結乾燥や噴霧乾燥などの乾燥技術により得ることができる。

死菌体を得る方法としては、細胞壁溶解酵素を作用させる方法の他に、低浸透圧で処理する方法、凍結融解する方法、高圧処理する方法、破碎処理する方法、加熱処理する方法などが挙げられる。中でも、菌体を加熱処理し自己融解させる方法は、コストをかけずに大量の菌体を処理できる点で好ましい。菌体抽出液は、上記のようにして得た洗浄菌体、菌体末、死菌体などに適切な溶媒を添加した後、遠心分離上清として得ることができる。

共役化処理能を有する *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, 又は *Bifidobacterium pseudocatenulatum* から選ばれる1種以上の細菌を用いて共役脂肪酸を製造するための共役化処理法としてより具体的には、例えば以下の(a)～(e)を挙げることができる。

- (a) 前記細菌を増殖培地や乳培地（発酵乳）中で培養して発酵生産の形で不飽和脂肪酸を共役化する方法
- (b) 不飽和脂肪酸を前記細菌の洗浄菌体で共役化する方法
- (c) 前記細菌菌末を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法
- (d) 前記細菌死菌体を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法
- (e) 前記細菌菌体抽出液を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法

以下、処理法(a)～(e)について詳述する。

(a) 前記細菌を増殖培地や発酵乳中で培養して発酵生産の形で不飽和脂肪酸を共役化する方法：

増殖培地あるいは発酵乳中で共役化を行う際は、基本操作は一般的に行われている手法で行えば良い。スターターとしては以下のものを用いるのが好ましい。

まず菌体調製において変換能を効率的に誘導するため、リノール酸などの不飽和脂肪酸をMRS (LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO社製) 培地などの乳酸菌用増殖培地やGAM培地 (GAM broth、日水製薬(株)社製) 等の嫌気性菌用増殖培地に添加した。この濃度は0～0.2%で、特に0.05～0.1%が好ましい。

この際の培養は、pH3.5～5.5で停止することが好ましく、特に、4.5～5.5で停止することが好ましい。pH3.5以下まで培養すると菌の過増殖により共役化能が低下してしまう場合もあり、pH5.5以上では共役化を行うのに十分な菌体量が得られないためである。

以上のようにして培養した培養液をスターターとして用いるのが好ましく、スターター接種量は発酵乳調整用培地の0.5～8%が好ましく、特に1～4%程度が好ましい。原料は培地中に0.02～0.8%程度が好ましく、特に0.1～0.2%が好ましい。培養温度は20～40℃程度、好ましくは28～37℃である。

より効率良く目的とする共役脂肪酸を得るためには培養はpH3.5～5.5で停止することが好ましく、特にpH4.5～5.5で停止することが好ましい。また、中和培養でも同様に目的とする共役脂肪酸を得ることが出来る。

(b) 不飽和脂肪酸を前記細菌の洗浄菌体で共役化する方法：

処理法(a)のスターター調製時と同様の培養条件によって培養した菌体を生理食塩水にて洗浄したものを回収し、緩衝液に懸濁させた。この菌体を懸濁させる緩衝液および洗浄菌体反応は適度なpHを維持できる条件の水溶液を用いて行う。例えば0.1～1.0Mのリン酸緩衝液が好ましく、pHは5.0～7.5であるが、好ましくは6.0～7.0である。菌体懸濁液の菌体濃度は、湿重で0.025～0.25%であり、好ましくは0.025～0.1%である。原料は、添加時の原料を牛血清アルブミン(BSA)との混合液としており原料濃度は反応溶液中に0.1～4.0%程度添加することが好ましく、特に0.3～1.0%が好ましい。

また、BSAの混合比率は原料に対して5分の1程度が好ましい。洗浄菌体による変換反応の際の温度は20～52℃だが、好ましくは32～37℃である。変換生成の適正な時間は1～96時間であり、好ましくは24～72時間である。なお、pHを中和しながら培養した菌体も同様に用いることが出来る。

(c) 前記細菌菌末を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法：

細菌菌末は、例えば処理法(a)のスターター調製時の培養条件と同様の方法にて得た細菌菌体を乾燥処理により粉末化することにより得ることが出来る。乾燥処理方法としては凍結乾燥、噴霧乾燥などを利用することができる。なお、菌末調製後の変換反応は、処理法(b)の洗浄菌体反応の反応条件と同様に行えば良い

。

(d) 前記細菌死菌体を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法：

前記細菌菌体は、例えば処理法(a)のスターター調製時の培養条件と同様の方法にて得た前記細菌菌体の細胞壁を破壊することにより得ることが出来る。細胞壁破壊は、細胞壁破壊酵素で処理する方法や、菌体を溶媒に懸濁させて低浸透圧で処理する方法、凍結融解する方法、高圧処理する方法、破碎処理する方法、加熱処理する方法などを利用することができる。細胞壁破壊液調整後の変換反応は、処理法(b)の洗浄菌体反応の反応条件と同様に行えばよい。

(e) 前記細菌菌体抽出液を用いて不飽和脂肪酸を共役化する方法：

前記細菌菌体抽出液としては、例えば処理法(b)～(d)と同様の方法にて得た前記細菌洗浄菌体、菌体末、死菌体などを適切な溶媒で抽出し、遠心分離などの方法により残渣を除去して得ることが出来る。なお、菌体抽出液調製後の反応は、処理法(b)の洗浄菌体反応の反応条件と同様に行えばよい。

上記(a)～(d)等、前記細菌により得られる反応液または培養液の脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフィー分析により内部標準物質と各脂肪酸の面積値の比率をもとに各脂肪酸量を算出できる。なお、例えば、共役リノール酸を対象とする場合には、ガスクロマトグラフィーは表1に示す条件で行えばよい。

表1

GC分析条件

GC system	; ジーエルサイエンス社製GC-353B ; GC14A (島津製作所製)
Colum	; DB-23 (ID 0.25mm x 30m)
Oven	; 160℃→220℃ (at 2℃/min)
Inj Temp	; 250℃
Det Temp	; 250℃
Carrier Gas	; N ₂ (50mL/min)
Detector	; FID
Sample Size	; 1 μL in hexane
Sprit	; 1/100

本発明により得られる共役脂肪酸は、医薬品、食品、化粧品等の形態で投与することができる。例えば共役リノールの生理効果を訴求する医薬品や栄養補助食品等の形態で用いる場合であれば、カプセル剤、顆粒剤、錠剤、散剤等の固形製剤、或いはシロップ剤等の液状製剤として経口投与することができる。また、経口投与剤でなくとも、注射剤、皮膚外用剤、直腸投与剤等非経口形態で投与することも可能である。

各製剤の製造時には、乳糖、澱粉、結晶セルロース、乳酸カルシウム、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム、無水ケイ酸等の賦形剤、白糖、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン等の結合剤、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク、モノグリセリド、蔗糖脂肪酸エステル等の滑沢剤や、その他、医薬・食品等として許容され得る成分を適宜使用すればよい。

また、同様の生理効果を期待して一般食品形態（「明らかな食品」の形態）で用いる場合には、本発明の方法により得られた共役脂肪酸をそのまま或いは適宜精製処理したものを油脂、錠菓、発酵乳、飴、調味料、ふりかけ等の飲食品に添加し、常法を用いて製造すればよい。発酵食品として用いる場合には、発酵原料中の二重結合を二つ以上有する脂肪酸を添加し、発酵菌により発酵（培養）させ、製造することができる。特にリノール酸を含む乳を発酵した発酵乳とすれば、前記のとおりcis-9,trans-11型共役リノール酸を特異的かつ多量に含有させることが容易であるため好ましい。

本発明は、特に、*Lactobacillus oris* ATCC 49062, *Lactobacillus pontis* ATCC 51518, *Lactobacillus pontis* ATCC 51519, *Lactobacillus panis* JCM 11053, *Bifidobacterium breve* YIT 10001, *Bifidobacterium breve* ATCC 15698, *Bifidobacterium breve* ATCC 15701, *Bifidobacterium bifidum* YIT 4007, *Bifidobacterium infantis* ATCC 15702 及び *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 から選ばれる1種以上を用いることにより、共役リノール酸の殆どがcis-9,trans-11型共役リノール酸である組成物を得ることができる。尚、本発明において、高含有cis-9,trans-11型共役リノール酸組成物とは、cis-9,trans-11型共役リノール酸を除く各種共役リノール酸異性体の比率が少なくとも全ての共役リノ

ール酸に対して、10%を越えない共役リノール酸組成物を指し、このような組成物は食品等への利用に際し、低い添加量で制癌作用等の生理作用を期待でき、風味面、作業性からも優れたものである。特に、cis-9,trans-11型共役リノール酸を除く各種共役リノール酸異性体の比率が4%を超えない組成であることが好ましい。

本発明は更に、上述の本発明による方法によって得られた共役脂肪酸を含有する飲食品も提供する。

なお、発酵乳とは、乳等省令により定められている発酵乳、乳製品乳酸菌飲料等の生菌含有タイプの飲料や殺菌処理の施された発酵乳を含有する乳性飲料、更には、ケフィア等のことである。発酵に際しては、その他の菌、例えば*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus gasseri*、*Lactobacillus zeae*、*Lactobacillus johnsonii*、*Lactobacillus delbrueckii*(ss.*bulgaricus*)、*Lactobacillus delbrueckii*(ss.*delbrueckii*)等の*Lactobacillus* 属細菌や*Streptococcus thermophilus* 等の*Streptococcus* 属細菌、*Lactococcus lactis*(ss.*lactis*)、*Lactococcus lactis*(ss.*cremoris*)、*Lactococcus plantarum*、*Lactococcus raffinolactis* 等の*Lactococcus* 属細菌、*Leuconostoc mesenteroides*、*Leuconostoc lactis* 等の*Leuconostoc* 属細菌、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium* 等の*Enterococcus* 属細菌等を使用できる。

また、*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium bifidum*、*Bifidobacterium longum*、*Bifidobacterium animalis* 等の*Bifidobacterium* 属細菌や酵母その他の微生物を使用しても良い。これらは、1種または2種以上を組み合わせ使用することができる。

また、これらの食品には、その他の食品素材、すなわち、各種糖質や乳化剤、増粘剤、甘味料、酸味料、果汁等を適宜配合してもよい。具体的には、蔗糖、異性化糖、グルコース、フラクトース、パラチノース、トレハロース、ラクトース、キシロース等の糖類、ソルビトール、キシリトール、エリスリトール、ラクチトール、パラチニット、還元水飴、還元麦芽糖水飴等の糖アルコール、ショ糖脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、レシチン等の乳化剤、カラギーナン、グァーガム、キサントガム、ペクチン、ローカストビーンガム等の増粘（安

定) 剤、が挙げられる。この他にも、ビタミンA、ビタミンB類等の各種ビタミン類やカルシウム、鉄、マンガン、亜鉛等のミネラル類を配合してもよい。

これら医薬品、食品等の形態での使用に際しては、本発明の方法により得られた共役脂肪酸を適宜配合することができる。また、共役脂肪酸の生理効果を訴求する場合であれば、その効果を得られかつ過剰摂取等の問題が生じない程度の量、10mg~1000mg/日程度の摂取が見込まれる量を適宜配合しておけば良い。

図面の簡単な説明

図1は*Lactobacillus oris* によって産生された共役リノール酸の異性体のガスクロマトグラムのチャートであり、a図はリノール酸標準品、b図は共役リノール酸標準品、c図は*Lactobacillus oris* による反応液のチャートを示す。尚、図中のピークAは内部標準物質(17:0)、ピークBはリノール酸、ピークCはcis-9, tran-11型共役リノール酸、ピークDはtrans-10, cis-12型共役リノール酸、ピークEは全cis型共役リノール酸、ピークFは全trans型共役リノール酸、ピークC + D + E + Fは共役リノール酸を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例になんら制約されるものではない。

実施例1：共役脂肪酸を産生する*Lactobacillus* 属細菌のスクリーニング

100mMリン酸緩衝液(pH6.5) 1mL中にリノール酸50mgとBSA 10mgを溶解し、あらかじめリノール酸-BSA-複合体溶液を調製した。

15mLの0.07%リノール酸含有MRS (LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO社製) 培地に*Lactobacillus* 属細菌を接種し、28℃、120rpm、20時間振盪培養した。得られた培養液はpH 4.7であった。

この培養液を遠心分離して菌体を回収し生理食塩水で2回洗浄して洗浄菌体を得た。この洗浄菌体にリノール酸-BSA-複合体溶液を100μL、100mMリン酸緩衝液(pH6.5) を0.9mL添加し、酸素吸収・炭酸ガス発生剤(Anaero Pack、三菱ガス化学(株)社製) にて嫌気状態に保った酸素不透過性のビニール袋内で37

℃、120rpmで24時間反応した。

得られた反応液に内部標準物質 (HEPTADECANOIC ACID) を1mg添加後Bligh-Dye法にて抽出し、メチルエステル化 (4%塩酸メタノール溶液で30分間室温静置) 後、ガスクロマトグラフィーの分析に供し脂肪酸分析を行った。

共役リノール酸のピークは標準品 (リノール油脂製 CLA80) のリテンションタイムを基準に判断し、基質として添加したリノール酸を100とした時の相対値を算出した。その結果、表2に示したように*Lactobacillus oris*で共役リノール酸の産生が認められた。この*Lactobacillus oris* NCD02160は、ATCC 49062としてアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) に登録されている。

表2

菌 種	基質のリノール酸を100とした時の共役リノール酸の値
菌無添加コントロール	0.1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0.0
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.1
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.3
<i>Lactobacillus casei</i>	0.1
<i>Lactobacillus casei</i>	0.1
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0.3
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0.0
<i>Lactobacillus mali</i>	0.0
<i>Lactobacillus oris</i> NCD0 2160	14.2
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0.0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0.0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0.0
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0.0
<i>Lactobacillus sake</i>	0.4

実施例2：共役脂肪酸を産生する*Bifidobacterium* 属細菌のスクリーニング

100mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) 1mL中にリノール酸50mgとBSA 10mgを溶解し、あらかじめリノール酸-BSA-複合体溶液を調製した。このリノール酸-

BSA-複合体溶液 200 μ L を GAM broth (日水製薬(株)社製) 15 mL に添加後、*Bifidobacterium* 15 菌株をそれぞれ接種し 35℃、120rpm、48 時間振盪培養し、*Bifidobacterium* 属細菌培養液を調製した。

15 mL 容試験管 (キャップ付き) に 5 mL 分注した 10% スキムミルク (グルコース 1%、大豆ペプチド 0.1% 添加) 培地に、リノール酸-BSA-複合体溶液を 100 μ L (リノール酸含量 5 mg) および先に調製した *Bifidobacterium* 属細菌培養液を 200 μ L 添加し、キャップを閉めた。この培地を 35℃、120rpm で 144 時間振盪培養し発酵乳を調製した。得られた発酵乳に内部標準物質 (HEPTADECANOIC ACID) を 1 mg 添加後 Bligh-Dyer 法にて抽出し、メチルエステル化 (4% 塩酸メタノール溶液で 30 分間室温静置) 後、ガスクロマトグラフィーの分析に供し脂肪酸分析を行った。結果を次の表 3 に示す。

表 3

144 時間培養発酵乳 (誘導: リノール酸)

単位 (mg/5mL)

菌株名	YIT No.	外部登録 機関 No.	培養 後 pH	リノール 酸	共役リノール酸			ヒドロキシ酸		
					c9- t11	t10- c12	all トランス	HOA1	HOA2	oth- ers
<i>B. adolescentis</i>	4011	ATCC 15703	3.6	1.08	0.00	0.00	0.00	0.08	1.32	0.56
<i>B. adolescentis</i>	4087	JCM 7042	3.6	1.04	0.00	0.01	0.00	0.10	1.57	0.33
<i>B. bifidum</i>	4007	FERM BP-791	3.5	3.84	0.02	0.00	0.00	0.07	0.18	0.69
<i>B. bifidum</i>	4013		5.2	1.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.85
<i>B. breve</i>	4064		3.6	3.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76
<i>B. breve</i>	4065		3.6	1.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46
<i>B. breve</i>	10001	FERM BP-8205	3.5	0.61	0.57	0.00	0.02	0.00	0.00	0.31
<i>B. catenulatum</i>	4016	ATCC 27539	3.3	2.99	0.00	0.00	0.00	0.06	0.49	0.66
<i>B. catenulatum</i>	4118	JCM 7130	4.4	3.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.73
<i>B. infantis</i>	4018	ATCC 15697	6.0	4.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.89
<i>B. infantis</i>	4019	ATCC 15702	4.7	0.87	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.52
<i>B. lactis</i>	4121	DSM 10140	4.3	3.81	0.00	0.00	0.00	0.05	0.07	0.61
<i>B. longum</i>	4021	ATCC 15707	3.8	2.81	0.00	0.00	0.00	0.06	0.56	0.70
<i>B. longum</i>	4037	ATCC 15708	3.6	0.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.27
<i>B. pseudocatenulatum</i>	4072	ATCC 27919	3.7	4.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.99

共役リノール酸のピークは標準品（リノール油脂製 CLA 80）のリテンションタイムを基準に判断し、解析を行った。その結果、*Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205)、*Bifidobacterium infantis* ATCC 15702、*Bifidobacterium bifidum* FERM BP-791、*Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 で共役リノール酸の産生が認められた。

特に、*Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205) は添加したリノール酸（5 mg）のうち 11.4% ($=0.57\text{mg}/5\text{mg} \times 100$) が共役リノール酸に変換されており、これら産生された共役リノール酸のほとんどが（96%以上 ($0.57/0.59 \times 100$ ））cis-9,trans-11型共役リノール酸であった。しかしながら、同じ*Bifidobacterium breve*でも*Bifidobacterium breve* YIT 4064や*Bifidobacterium breve* YIT 4065には共役リノール酸産生活性は認められず、共役リノール酸産生活性は*Bifidobacterium breve*の中でも特別な菌株に限定されることが確認された。

実施例 3 : *Lactobacillus* 属細菌の共役脂肪酸の異性体の同定

実施例 1 で *Lactobacillus oris* によって産生された共役リノール酸の異性体を調べた。図 1 は *Lactobacillus oris* によって産生された共役リノール酸の異性体のガスクロマトグラムのチャートである。図 1 に示したように *Lactobacillus oris* によって産生された共役リノール酸の全てが cis-9,trans-11型共役リノール酸であった。以上の結果から、数ある乳酸菌の中で *Lactobacillus oris* が選択的、且つ高い含有率で効率的に cis-9,trans-11型共役リノール酸を産生することが明らかとなった。

実施例 4 : 発酵乳中での *Lactobacillus* 属細菌の共役脂肪酸の産生

100 mM リン酸緩衝液（pH 6.5）1 mL 中にリノール酸 50 mg と BSA 10 mg を溶解し、あらかじめリノール酸-BSA-複合体溶液を調製した。このリノール酸-BSA-複合体溶液 200 μL を MRS (LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO 社製) 培地 15 mL に添加後、*Lactobacillus oris* を接種し 28℃、120 rpm、20 時間振盪培養し、pH 4.7 の培養液を調製した。

15 mL 容試験管（キャップ付き）に 5 mL 分注した 10% スキムミルク（グ

ルコース 1 %、大豆ペプチド 0.1 % 添加) 培地に、リノール酸-BSA-複合体溶液を 100 μ L、先に調製した各菌株の培養液を 200 μ L 添加し、キャップを閉めた。この培地を 28℃、120 rpm で 48 時間培養し pH 4.6 の発酵乳を調製し、実施例 1 と同様に脂肪酸分析を行った。

その結果、添加したリノール酸の 2.0 % が共役リノール酸に変換されていた。産生された共役リノール酸の全てが cis-9, trans-11 型共役リノール酸であり、実施例 3 と同様の結果が得られた。以上の結果から、発酵乳中でも *Lactobacillus oris* が選択的、且つ効率的に cis-9, trans-11 型共役リノール酸を産生することが明らかとなった。

実施例 5 : *Bifidobacterium* 属細菌の洗浄菌体反応における共役脂肪酸の産生

100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1 mL 中にリノール酸 50 mg と BSA 10 mg を溶解し、あらかじめリノール酸-BSA-複合体溶液を調製した。

このリノール酸-BSA-複合体溶液を 15 mL の GAM broth (日水製薬(株)社製) に 0.07 % の割合で添加した後 *Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205) をそれぞれ接種し、35℃、120 rpm、48 時間振盪培養した。この培養液を遠心分離して菌体を回収し生理食塩水で 2 回洗浄して洗浄菌体を得た。

この洗浄菌体にリノール酸-BSA-複合体溶液を 100 μ L、100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) を 0.9 mL 添加し、窒素ガスにて気相を置換後密栓をし試験管内を嫌気状態に保ち 37℃、120 rpm で 72 時間反応した。

得られた反応液に内部標準物質 (HEPTADECANOIC ACID) を 1 mg 添加後 Bligh-Dyer 法にて抽出し、メチルエステル化 (4 % 塩酸メタノール溶液で 30 分間室温静置) 後、ガスクロマトグラフィーの分析に供し脂肪酸分析を行った。

その結果、*Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205) では、添加した基質中のリノール酸の 0.9 % が cis-9, trans-11 型共役リノール酸に変換されていた。

実施例 6 : *Lactobacillus oris* 死菌体による共役脂肪酸の産生

100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1 mL 中にリノール酸 50 mg と BSA 10 mg を溶解し、あらかじめリノール酸-BSA-複合体溶液を調製した。このリノール酸

—BSA—複合体溶液 200 μ L を MRS (LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO 社製) 培地 15 mL に添加後、*Lactobacillus oris* を接種し 28℃、120 rpm、20 時間振盪培養し、pH4.7 の培養液を調製した。

この培養液 0.5 mL を、0.3% glc 加 I L S 培地 15 mL に接種し、37℃、120 rpm で 18 時間 (pH5.6 まで) 培養し、遠心分離して菌体を回収し 0.2 M グリシン緩衝液 (pH10.6) で 2 回洗浄し、洗浄後菌体を 6.7% 蔗糖—50 mM トリスアミノメタン—1 mM EDTA 溶液 2 mL に溶解した。この液に lysozyme 溶液 (10 mg/mL in 25 mM トリスアミノメタン, pH8.0、生化学工業 (株) 社製) 0.8 mL および N-Acetylmuramidase 水溶液 (1 mg/mL、生化学工業 (株) 社製) 0.15 mL を添加し、37℃、120 rpm で 30 分反応した。反応液をセントリプレップ 10 (amicon 社製) に移し濃縮操作を行うことにより *Lactobacillus oris* 死菌体懸濁液を約 0.6 mL 得た。

この死菌体懸濁液にリノール酸—BSA—複合体溶液を 100 μ L、100 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) を 0.9 mL 添加し、酸素吸収・炭酸ガス発生剤 (Anaero Pack、三菱ガス化学 (株) (株) 社製) にて嫌気状態に保った酸素不透過性のビニール袋内で 37℃、120 rpm で 24 時間反応した。

得られた反応液について実施例 1 と同様に脂肪酸分析を行った結果、添加したリノール酸の 1.6% が共役リノール酸に変換されていた。産生された共役リノール酸の全てが cis-9, trans-11 型共役リノール酸であり、洗浄菌体および発酵乳中と同様の結果が得られた。以上の結果から、細胞壁を破壊した死菌体でも *Lactobacillus oris* が選択的、且つ効率的に cis-9, trans-11 型共役リノール酸を産生することが明らかとなった。

実施例 7 : *Lactobacillus pontis* による共役脂肪酸の産生

100 mM リン酸緩衝液 (pH6.5) 1 mL 中にリノール酸 50 mg と BSA 10 mg を溶解し、あらかじめリノール酸—BSA—複合体溶液を調製した。このリノール酸—BSA—複合体溶液 200 μ L を MRS (LACTOBACILLI MRS BROTH、DIFCO 社製) 培地 15 mL に添加後、*Lactobacillus pontis* (ATCC 51518) を接種し 28℃、120 rpm、48 時間振盪培養し、pH4.9 の培養液を調製した。

15 mL 容試験管（キャップ付き）に5 mL 分注した10%スキムミルク培地を滅菌後、リノール酸-BSA-複合体溶液を100 μ L、先きに調整した各菌株の培養液を400 μ L 添加し、キャップを閉めた。この培地を28℃、120 rpmで48時間培養し、pH5.5の発酵乳を調整し、実施例1と同様に脂肪酸分析を行った。

その結果、添加したリノール酸の0.5%が共役リノール酸に変換されていた。産生された共役リノール酸の全てがcis-9,trans-11型共役リノール酸であった。以上の結果から、*Lactobacillus pontis*が選択的、且つ高い含有率で効率的にcis-9,trans-11型共役リノール酸を産生することが明らかとなった。

実施例8：*Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205)を用いた共役リノール酸含有発酵食品の調製

脱脂粉乳を10%、グルコースを1%、大豆ペプチドを0.1%含む培地に、基質としてリノール酸を0.1%または1.0%添加して150 kg/cm²の均質化処理を行った後、オートクレーブで115℃、10分間の滅菌処理を行い発酵食品調製用培地を作製した。

GAM broth(日水製薬(株)社製)15 mLに*Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205)を接種し35℃、120rpm、48時間振盪培養し、*Bifidobacterium* 属細菌培養液を調製した。この培養液6 mLを先に作製した発酵食品調製用培地150 mLに接種し、気相を窒素ガスにて置換後、嫌氣的に35℃、120rpmで72時間静置培養し発酵食品を調製した。

得られた反応液について実施例2と同様に脂肪酸分析を行った結果、添加したリノール酸の一部が、共役リノール酸に変換されていることが判った。産生された共役リノール酸の全てがcis-9,trans-11型共役リノール酸であった。

また、調製した発酵食品の官能評価を行ったところ、リノール酸無添加のものと同等のものが得られた。

請求の範囲

1. *Lactobacillus oris* , *Lactobacillus pontis* , *Lactobacillus panis* , *Bifidobacterium breve* , *Bifidobacterium infantis* , *Bifidobacterium bifidum*, 又は*Bifidobacterium pseudocatenulatum* の細菌種から選ばれる 1 種以上の共役化処理能を有する細菌の生菌、死菌体、菌体抽出液又は該細菌より得た酵素を用いて、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化する工程を含むことを特徴とする共役脂肪酸の製造法。

2. 前記共役化処理能を有する細菌として、*Lactobacillus oris* ATCC 49062, *Lactobacillus pontis* ATCC 51518, *Lactobacillus pontis* ATCC 51519, *Lactobacillus panis* JCM 11053, *Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205), *Bifidobacterium breve* ATCC 15698, *Bifidobacterium breve* ATCC 15701, *Bifidobacterium bifidum* YIT 4007 (FERM BP-791), *Bifidobacterium infantis* ATCC 15702 及び*Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919から選ばれる 1 種以上を用いることを特徴とする請求項 1 に記載の共役脂肪酸の製造法。

3. 二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸として、リノール酸を用いることを特徴とする請求項 1 に記載の共役脂肪酸の製造法。

4. 前記共役化する工程が、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を含有する培地に、前記共役化処理能を有する細菌を接種し、培養する工程を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の共役脂肪酸の製造法。

5. 前記培地として乳培地を用いて、共役脂肪酸含有発酵乳を得ることを特徴とする請求項 4 に記載の共役脂肪酸の製造法。

6. 前記培地として脂質結合タンパク質及び界面活性剤を含まない乳培地を用いて、共役脂肪酸含有発酵乳を得ることを特徴とする請求項 4 に記載の共役脂肪

酸の製造法。

7. 前記共役化処理能を有する細菌として、

リノール酸を共役リノール酸に変換する能力を有し、

次の(a) 及び(b) 工程によって、培地中に添加された基質のリノール酸を100とした場合の共役リノール酸の値が10を越える共役リノール酸を産生する能力を有する細菌を用いることを特徴とする請求項1に記載の共役脂肪酸の製造法。

(a) リノール酸と、BSA、脂質結合蛋白質および界面活性剤から選ばれる少なくとも1種の素材との複合体を含む増殖培地にて少なくとも12時間前培養する工程、

(b) リノール酸を含む乳培地に、工程(a) で得られた共役化処理能を有する細菌を接種し予め定められた時間振盪培養する工程、

8. 共役化処理能を有する細菌の生菌、死菌体、菌体抽出液又は該細菌より得た酵素を用いて、リノール酸を共役化する共役リノール酸を含む組成物を得る製造法において、

前記細菌として、*Lactobacillus oris* ATCC 49062, *Lactobacillus pontis* ATCC 51518, *Lactobacillus pontis* ATCC 51519, *Lactobacillus panis* JCM 11053, *Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205), *Bifidobacterium breve* ATCC 15698, *Bifidobacterium breve* ATCC 15701, *Bifidobacterium bifidum* YIT 4007 (FERM BP-791), *Bifidobacterium infantis* ATCC 15702 及び *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC 27919 から選ばれる1種以上を用いることにより、共役リノール酸の殆どがcis-9, trans-11型共役リノール酸である高含有cis-9, trans-11型共役リノール酸組成物を得ることを特徴とする高含有cis-9, trans-11型共役リノール酸組成物の製造法。

9. 次の(a) 及び(b) 工程によって、培地中に添加された基質のリノール酸を100とした場合の共役リノール酸の値が10を越える共役リノール酸を産生す

る能力を有する細菌の共役化処理への使用。

(a) リノール酸と、B S A、脂質結合蛋白質および界面活性剤から選ばれる少なくとも1種の素材との複合体を含む増殖培地にて少なくとも12時間前培養する工程、

(b) リノール酸を含む乳培地に、工程(a)で得られた共役化処理能を有する細菌を接種し予め定められた時間浸透培養する工程、

10. 前記細菌が*Lactobacillus oris* ATCC 49062又は*Bifidobacterium breve* YIT 10001 (FERM BP-8205)であることを特徴とする請求項9に記載の細菌の共役化処理への使用。

11. 請求項1に記載の方法により得られた共役脂肪酸を含有する飲食品。

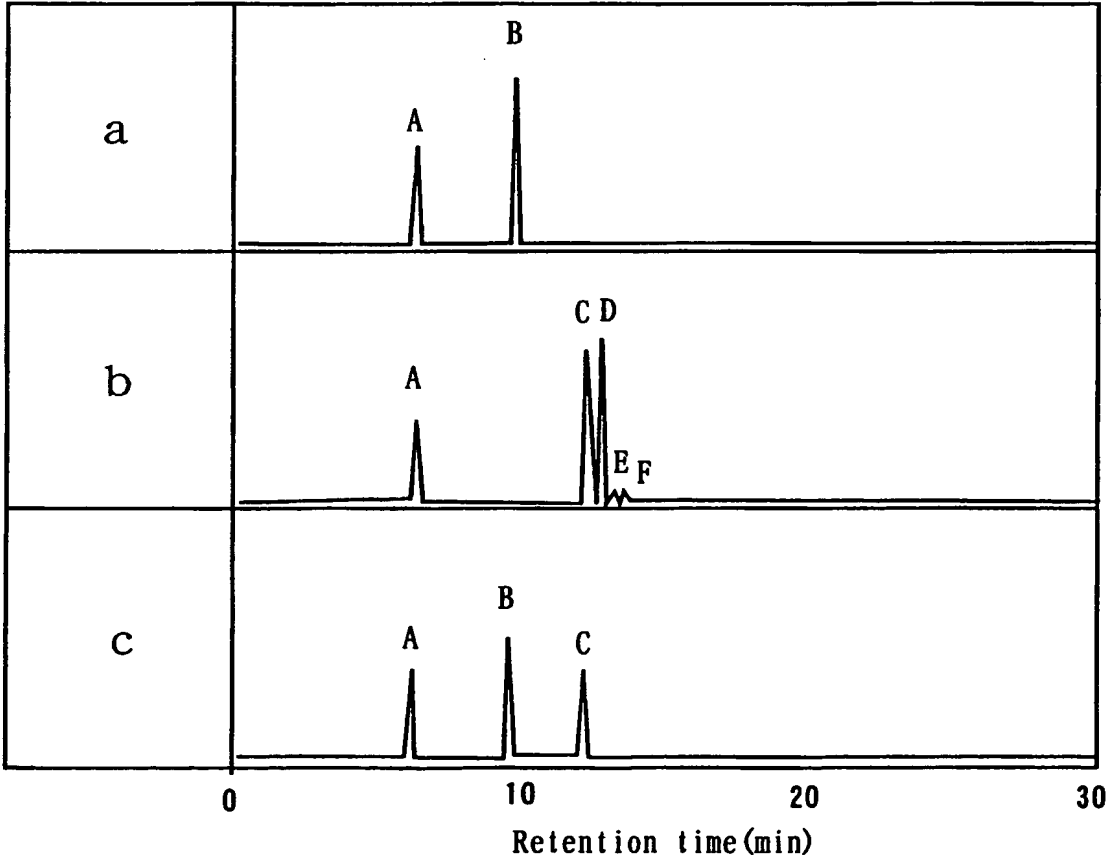


Fig.1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/04633

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12P7/64, C11C3/14, A23L1/054

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12P7/64, C11C3/14, A23L1/054

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JICST), BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shigenobu KISHINO et al., Conjugated Linoleic Acid Production from Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria., J. Am. Oil Chem. Soc., (2002 February), Vol.79, No.2, pages 159 to 163	1-11
Y	Jun OGAWA et al., "Biseibutsu ni yoru Kyoeki Shibosan no Seisan", Yukagaku Toronkai Yoshishu, (2001), Vol.40th, pages 53 to 54	1-11
Y	Tung Y. Lin, Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives., Food Chemistry, (2000), Vol.69, No.1, pages 27 to 31	1-11
P, X	EP 1264893 A (TEAGASC DAIRY PROD RED CENT), 11 December, 2002 (11.12.02), & WO 02/101056 A2	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 July, 2003 (09.07.03)

Date of mailing of the international search report
22 July, 2003 (22.07.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/04633**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The matter common to the inventions as set forth in claims 1 to 11 resides in a process for producing a conjugated fatty acid which comprises conjugating an unsaturated fatty acid having at least two double bonds with the use of viable cells, dead cells or a cell extract of a lactic acid bacterium or an enzyme obtained from this bacterium. As the results of the search, it is clarified that the matter common to claims 1 to 11 is not novel, since it had been disclosed that CLA, i.e., a conjugated fatty acid having two or more double bonds was produced using lactic acid bacteria such as *Lactobacillus* and a strain capable of converting linoleic acid into CLA was screened from various lactic acid bacteria including (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
The parts relating to *Lactobacillus oris* in claims 1 to 11.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Lactobacillus and Bifidobacterium (Shigenobu KISHINO, et al., J. Am. Oil Soc. (2002. Feb.), Vol. 79, No.2, p.159-163; and Jun OGAWA, et al., Yukagaku Toronkai Yoshishu (2001), Vol. 40th, p.53-54).

Accordingly, it is recognized that each of the processes for producing a conjugated fatty acid respectively using *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus panis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterius pseudocatenulatum*, which are each a lactic acid bacterium, is a novel process for producing a conjugated fatty acid. Such being the case, it is considered that the inventions as set forth in claims 1 to 11 involve 7 groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12P7/64, C11C3/14, A23L1/054		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12P7/64, C11C3/14, A23L1/054		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JSTPlus(JICST)、BIOSIS/WPI(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Shigenobu KISHINO, et. al., Conjugated Linoleic Acid Production from Linoleic Acid by Lactic Acid Bacteria., J. Am. Oil Chem. Soc. (2002. Feb.), Vol. 79, No. 2, p. 159-163	1-11
Y	小川順, 他, 微生物による共役脂肪酸の生産, 油化学討論会要旨集(2001), Vol. 40th, p. 53-54	1-11
Y	Tung Y. Lin, Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and additives., Food Chemistry(2000), Vol. 69, No. 1, p. 27-31	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
09.07.03	22.07.03	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 美葉子	4N 9839
	電話番号 03-3581-1101	内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	EP 1264893 A1 (TEAGASC DAIRY PROD RED CENT) 2002. 12. 11 & WO 02/101056 A2	1 - 1 1

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-11に係る発明に共通の事項は、乳酸菌の生菌、死菌体、菌体抽出液又は該菌より得た酵素を用いて、二重結合を少なくとも二つ以上有する不飽和脂肪酸を共役化する共役脂肪酸の製造方法であるが、調査の結果、文献 Shigeno bu KISHINO, et. al., J. Am. Oil Chem. Soc. (2002. Feb.), Vol. 79, No. 2, p. 159-163、小川順、他、油化学討論会要旨集(2001), Vol. 40th, p. 53-54には、Lactobacillus等の乳酸菌により二重結合を二つ以上有する共役脂肪酸であるCLAを生産すること、LactobacillusやBifidobacterium等の様々な乳酸菌を対象にリノール酸をCLAへと変換する菌をスクリーニングする旨が開示されていることから、請求の範囲1-11に共通の事項は新規でないことが明らかとなった。

したがって、乳酸菌の一種である、Lactobacillus oris、Lactobacillus pontis、Lactobacillus panis、Bifidobacterium breve、Bifidobacterium infantis、Bifidobacterium bifidum、Bifidobacterium pseudocatenulatumによって共役脂肪酸を製造する方法は、それぞれ新規な共役脂肪酸の製造方法であると認められるから、請求の範囲1-11に係る発明には7個の発明群が含まれると認められる。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-11のうち、Lactobacillus orisに関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。